



УДК 616.379-008.64+616.71-007.234]:616.71-008.9:577.121.7]-07-06

Abstract**V. I. Kryvenko****O. I. Borodavko,***Zaporizhzhia State Medical University,
26 Maiakovskogo ave.,
Zaporizhzhia, 69035***RELATIONSHIP OF OXIDATIVE STRESS WITH THE INDICATORS OF BONE METABOLISM IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND OSTEOPOROSIS**

The literature data indicate that there is a close relationship between carbohydrate metabolism and bone metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus (DM). It is important to find the factors that lead to changes in bone turnover in patients with type 2 DM. One of these factors may be oxidative stress (OS).

The purpose of the study analysis of the relationship between the parameters of bone metabolism and oxidative stress in patients with a combined course of diabetes mellitus type 2 and osteoporosis (OP).

Materials and methods. Study of 94 patients, of which 1-st group – 22 patients with OP, 2-nd group – 22 patients with type 2 DM, 3-rd group – 50 patients with combined course of these diseases. An ultrasound densitometry on an Omnisense 7000 ultrasound densitometer (BeamMedLtd, Israel) was performed for all patients. The bone tissue assessment been performed according to the WHO criteria. The levels of osteocalcin (OK), parathyroid hormone, calcitonin in blood serum, the level deoxypyridinoline (DPD) was determined in morning urine for all patients. The OS intensity was assessed by the nitrotyrosine level in the serum.

Results. In patients with a combined course of type 2 diabetes and OP bone metabolism, there is a significant reduction in the levels of OC and DPD by 44 % and 24 % compared to patients who did not have type 2 DM ($p < 0.05$). In patients with a combined course of type 2 DM and OP, the severity of the OS increases, which is confirmed by a significant increase in the level of nitrotyrosine in 2.8 times compared with patients with OP and 2.1 times – with type 2 DM ($p < 0.05$). In patients with combined course of type 2 DM and OP recorded negative relationship between bone metabolism and OS, as evidenced by the presence of significant association between levels nitrotyrosine, OC, DPD, parathyroid hormone and calcitonin.

Conclusion. The relationship between nitrotyrosine and indicators of bone metabolism may indicate the significant role of reactive oxygen species in decreasing bone turnover in patients with combined course of type 2 DM and OP.

Keywords: oxidative stress, bone metabolism, type 2 diabetes mellitus, osteoporosis.

Corresponding author: oleo1714@gmail.com

Резюме**В. І. Кривенко****О. І. Бородавко,***Запорізький державний медичний університет, проспект Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035***ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ З ПОКАЗНИКАМИ КІСТКОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ ТА ОСТЕОПОРОЗ**

Дослідження проведене із метою аналізу взаємозв'язку між параметрами кісткового метаболізму та оксидативного стресу (ОС) у хворих з поєднаним перебігом цукрового діабету (ЦД) 2 типу та остеопорозу (ОП). Обстежено 94 особи, віком від 50 до 70 років. До 1-ї групи включено 22 хворих на ОП, до 2-ї – 22 пацієнти з ЦД 2 типу, до 3-ї – 50 хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП. Усім пацієнтам проводилась ультразвукова денситометрія на ультразвуковому денситометрі Omnisense 7000 (BeamMedLtd, Ізраїль). Оцінка стану кісткової тканини проводилась за критеріями ВООЗ. Також хворим визначали рівень остеокальцину, паратгормону, кальцитоніну у сироватці крові, рівень дезоксипіридиноліну визначали у ранковій сечі. Інтенсивність ОС оцінювали за рівнем нітротирозину у сироватці крові. У хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП виявлено зниження кісткоутворення та резорбції на фоні підвищення інтенсивності ОС, у порівнянні з пацієнтами, які не мали ЦД 2 типу ($p < 0,05$). У даній категорії хворих реєструється негативний взаємозв'язок між параметрами кісткового метаболізму та ОС, що підтверджується наявністю достовірного зв'язку між рівнями нітротирозину, остеокальцину, дезоксипіридиноліну, паратгормону та кальцитоніну. Таким чином, наявність взаємозв'язків між нітротирозином та показниками кісткового метаболізму може свідчити про значну роль активних форм кисню у зниженні кісткового обміну у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП.

Ключові слова: оксидативний стрес, кістковий метаболізм, цукровий діабет 2 типу, остеопороз.

Резюме**В. І. Кривенко****О. І. Бородавко,***Запорожский государственный медицинский университет, пр. Маяковского, 26, г. Запорожье, Украина, 69035***ВЗАИМОСВЯЗЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КОСТНОГО МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ОСТЕОПОРОЗОМ**

Исследование проведено с целью анализа взаимосвязи между параметрами костного метаболизма и оксидативного стресса (ОС) у больных с сочетанным течением сахарного диабета (СД) 2 типа и остеопороза (ОП). Обследовано 94 человека в возрасте от 50 до 70 лет. В 1-ю группу включено 22 больных ОП, во 2-ю – 22 пациента с СД 2 типа, в 3-ю – 50 больных с сочетанным течением СД 2 типа и ОП. Всем пациентам проводилась ультразвуковая денситометрия на ультразвуковом денситометре Omnisense 7000 (BeamMedLtd, Израиль). Оценка состояния костной ткани проводилась по критериям ВОЗ. Также больным определяли уровень остеокальцина, паратгормона, кальцитонина в сыворотке крови, уровень дезоксипиридинолина определяли в утренней моче. Интенсивность ОС оценивали по уровню нитротирозина в сыворотке крови. У больных с сочетанным течением СД 2 типа и ОП выявлено снижение костеобразования и резорбции на фоне повышения интенсивности ОС, по сравнению с пациентами, которые не имели СД 2 типа ($p < 0,05$). В данной катего-

рии больных регистрируется отрицательная взаимосвязь между параметрами костного метаболизма и ОС, что подтверждается наличием достоверной связи между уровнями нитротирозина, остеокальцина, дезоксипиридинолина, паратгормона и кальцитонина. Таким образом, наличие взаимосвязей между нитротирозином и показателями костного метаболизма может свидетельствовать о значительной роли активных форм кислорода в снижении костного обмена у больных с сочетанным течением СД 2 типа и ОП.

Ключевые слова: оксидативный стресс, костный метаболизм, сахарный диабет 2 типа, остеопороз.

Автор, відповідальний за листування: oleo1714@gmail.com

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) 2 типу та остеопороз (ОП) є важливими медико-соціальними проблемами суспільства, так як мають високу розповсюдженість та характеризуються розвитком небезпечних ускладнень [1]. Дані останніх досліджень вказують на наявність тісного взаємозв'язку між вуглеводним обміном та кістковим метаболізмом у хворих на ЦД 2 типу [2]. Проте, патогенетичні механізми даних процесів залишаються нез'ясованими, а пошук факторів, які призводять до змін у кістковому обміні у хворих на ЦД 2 типу є актуальною проблемою сучасної медицини.

Одним із спільних етіологічних чинників, як ЦД 2 типу, так і ОП є оксидативний стрес (ОС) – пошкодження тканин у результаті збільшення кількості активних форм кисню та недостатності антиоксидантного захисту [3]. Серед численних маркерів ОС особливу увагу приділяють нитротирозину. Нитротирозин є специфічним маркером окисного ушкодження білків та вказує на патологічну активність пероксинітриду – одного з найбільш сильних окисників, який викликає нитротрування білків, мітохондріальну дисфункцію та апоптоз [4]. Встановлено, що у хворих на ЦД 2 типу підвищується рівень нитротирозину та провокує розвиток ускладнень [5]. Проте, у літературі немає єдиної думки щодо взаємозв'язку між ОС та кістковим метаболізмом у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП, що потребує подальших досліджень.

Мета дослідження: вивчення показників кісткового метаболізму, оксидативного стресу та їх взаємозв'язків у хворих з поєднаним перебігом цукрового діабету 2 типу та остеопорозу.

Матеріали та методи. У дослідження включено 94 особи (від 50 до 70 років), які постійно проживали у м. Запоріжжі та проходили амбула-

торне та стаціонарне лікування на базі навчально-наукового медичного центру «Університетська клініка» Запорізького державного медичного університету. До 1-ї групи включено 22 хворих на ОП, до 2-ї – 22 пацієнти з ЦД 2 типу, до 3-ї – 50 хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП. Виділені групи статистично не різнилися за статтю та віком. Пацієнти 2 та 3 груп мали середню важкість перебігу захворювання та достовірно не відрізнялися за тривалістю анамнезу ЦД 2 типу.

Критерії включення у дослідження: підписана інформована згода пацієнта на участь у дослідженні, верифікований діагноз цукрового діабету 2 типу, наявність остеопорозу у хворих 1-ї та 3-ї груп, вік від 50 до 70 років. Критерії виключення: цукровий діабет 1 типу, вторинно інсулінозалежний ЦД 2 типу, прийом глюкокортикостероїдів понад 3 місяці, порушення функції щитоподібної залози, хронічна серцева недостатність, хронічна хвороба нирок, системні захворювання сполучної тканини, жінки з передчасною (до 45 років) або штучною менопаузою.

Усім пацієнтам проводилась ультразвукова денситометрія на ультразвуковому денситометрі Omnisense 7000 (BeamMedLtd, Ізраїль) по трьох кістках: проксимальна фаланга III пальця кисті, дистальний відділ 1/3 променевої кістки, середина великогомілкової кістки. Оцінка стану кісткової тканини проводилась за показником Т-критерію: нормальний стан – Т-критерій > -1,0 SD, остеопенія – Т-критерій – від -1,0 до -2,5 SD, остеопороз – Т-критерій < -2,5 SD [6].

Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за рівнем нитротирозину (набір реактивів фірми Hycult Biotech, Нідерланди) у сироватці крові, який досліджували імуноферментним методом на мікропланшетному фотометрі Immunochem-2100 (High Technology, США).

Усім хворим проводили дослідження рівня остеокальцину (набір реактивів фірми Immunodiagnostic Systems Limited, Англія), дезоксипіридиноліну сечі (набір реактивів фірми Quidel Corporation, США), кальцитоніну, паратгормону (набір реактивів Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., Англія), за допомогою імуноферментного методу на мікропланшетному фотометрі Immunochem-2100 (High Technology, США).

У роботі дотримано принципів біоетики: основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.), GCP (1996 р.), Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964–2000 рр.) і наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000.

Статистична обробка проводилась за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 13.0» for Windows (Stat Soft Inc., №JPZ8041382130 ARCN10-J). Аналіз показників на нормальність розподілу проводили методом Шапіро-Уїлка.

Дані описової статистики представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартного відхилення при нормальному розподілі признаку, а при розподілі, що відрізняється від нормального, – у вигляді медіани та міжквартильного розмаху. Порівняння параметрів у досліджуваних групах проводили за допомогою t-критерію Стюдента і тесту Манна-Уїтні залежно від розподілу ознаки. Для визначення характеру та сили зв'язку між досліджуваними показниками використовували коефіцієнт кореляції Пірсона або Спірмана в залежності від характеру розподілу даних. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати. Дані таблиці 1 відображають результати проведення ультразвукової денситометрії з використанням датчиків для фаланги пальця, променевої і великогомілкової кісток. У 2 групі Т-критерій за всіма зонами обстеження достовірно відрізнявся у порівнянні з 1 та 3 групами. Проте, 1 та 3 групи достовірно не різнилися за даним показником.

Таблиця 1 – Показники ультразвукової денситометрії у хворих на цукровий діабет 2 типу, остеопороз та при поєднаному їх перебігу

Показники	1 група ОП N = 22	2 група ЦД 2 типу N = 22	3 група ЦД 2 типу + ОП N = 50
Т-критерій radius, SD	-2,4±0,8	-0,1±0,6*#	-2,5±0,6
Т-критерій tibia, SD	-1,7±1,0	0,1±0,6*#	-1,6±0,9
Т-критерій phalanx, SD	-0,9±0,6	0,5±0,9*#	-1,1±0,5

Примітка: * $p < 0,01$ у порівнянні з пацієнтами 1 групи;

$p < 0,01$ у порівнянні з пацієнтами 3 групи

У хворих 3-ї групи рівень маркерів кісткового обміну був достовірно нижчим у порівнянні з пацієнтами 1-ї та 2-ї груп. Концентрація остеокальцину (ОК) та ДППД була нижчою відповідно на 44 % та 24 % ($p < 0,05$) у порівнянні з хвори-

ми 1-ї групи, та на 8,5 та 17 % ($p < 0,05$) – у порівнянні з 2-ю групою. Також, у 3-й групі визначалось достовірне зниження рівня ПТГ на 28 % ($p < 0,05$) у порівнянні з хворими 1-ї групи (табл.2).

Таблиця 2 – Рівень нітротирозину та маркерів кісткового метаболізму у хворих на цукровий діабет 2 типу, остеопороз та при поєднаному їх перебігу

Показники	1 група ОП N = 22	2 група ЦД 2 типу N = 22	3 група ЦД 2 типу + ОП N = 50
Остеокальцин, нг/мл	17,4 (12,1; 29,3)	10,6 (8,4; 13,1)	9,7 (6,0; 12,1)*#
ДППД, нмоль ДППД/моль креатиніну	8,7 (6,8; 11,8)	8 (6,1; 9,3)	6,6 (4,6; 8,4)*#
Кальцитонін, пг/мл	2,0 (2,0; 5,0)	2,3 (2,0; 13,3)	2,0 (2,0; 2,5)
Паратгормон, пг/мл	41,8 (29,4; 51,6)	27,8 (24,4; 32,4)	30,1 (20,2; 38,5)#
Нітротирозин нмоль/мл	18,9 (12,1–31,3)	14,4 (12,0–18,1)	41,4 (11,7–56,5)*#

Примітка: * $p < 0,05$ у порівнянні з пацієнтами 2 групи

$p < 0,05$ у порівнянні з пацієнтами 1 групи

При оцінці стану ОС у осіб з коморбідним перебігом ЦД 2 типу та ОП зареєстровано достовірне підвищення рівня нітротирозину у 2,9 рази ($p < 0,05$) порівняно з першою групою та у 2,2 рази – з другою ($p < 0,01$) (табл. 2).

При проведенні кореляційного аналізу маркерів кісткового метаболізму та ОС у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП виявлено, що підвищення рівня нітротирозину достовірно асоціювалось зі зниженням рівня ОК та ДППД відповідно $r = -0,38$ ($p < 0,05$), $r = -0,40$ ($p < 0,05$). Також концентрація нітротирозину мала достовірний взаємозв'язок з рівнем кальцитоніну та ПТГ відповідно $r = -0,34$ ($p < 0,05$), $r = -0,29$ ($p < 0,05$).

Обговорення результатів

Виснавлені дані свідчать про уповільнення у хворих 3 групи метаболічних процесів у кістковій тканині, а розвиток ОП у даної категорії хворих асоціюється зі зниженням функції остеобластів, а не за рахунок збільшення кісткової резорбції. За показником ОК, отримані результати співпадають з дослідженнями інших науковців [7]. Проте, у літературі залишається недостатньо вивченим питання щодо динаміки маркерів кісткової резорбції. Так, за даними ряду вчених, кісткова резорбція у хворих на ЦД 2 типу може як підвищуватися, так і знижуватися [2], що потребує подальших досліджень.

Визначення рівня ПТГ також є важливим для оцінки кісткового обміну, так як він регулює обмін кальцію та стимулює резорбцію [8]. У нашому дослідженні рівень ПТГ також був достовірно нижчим у пацієнтів 3 групи, що вказує на зниження резорбтивних процесів у кістковій тканині.

Зниження кісткового обміну у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП потребує пошуку факторів, які впливають на кістковий метаболізм. За даними науковців, підвищене утворення активних форм кисню може бути одним із таких чинників [9]. Саме тому, при подальшому дослідженні ми дослідили виразність ОС у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП. Отримані дані вказують на високу окислювальну модифікацію оксиду азоту у пацієнтів з коморбідним перебігом ЦД 2 типу та ОП та свідчать про істотну інтенсифікацію хронічного ОС.

Науковці відводять важливу роль ОС у патогенезі розвитку ЦД 2 типу і його прогресуванні,

так як вільні радикали кисню мають цитотоксичну дію на β -клітини підшлункової залози, що призводить до порушення секреції інсуліну та інсулінорезистентності [10]. Гіперглікемія при ЦД 2 типу є пусковим механізмом активації ОС, адже накопичення кінцевих продуктів глікозування в тканинах призводить до утворення вільних радикалів [11].

Проте, результати дослідників щодо зв'язку ОС та ОП не однозначні. Дані деяких досліджень вказують на взаємозв'язок маркерів ОС та мінеральної щільності кісткової тканини, проте залишається невідомим чи можуть вільні радикали відігравати важливу роль у розвитку ОП та впливати на кістковий обмін.

У нашому дослідженні підвищення ОС у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП асоціювалось зі зниженням маркерів кісткового метаболізму. Зниження кісткоутворення можна, зокрема, пояснити накопиченням активних форм кисню, які призводять до підвищеної секреції склеростину остеобlastами, який блокує шлях Wnt [12].

Проте, стан кісткової резорбції залишається питанням дискусії, на думку ряду науковців ОС призводить до підвищення кісткової резорбції [13]. За результатами нашого дослідження у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП резорбція кісткової тканини знижувалась та мала негативний взаємозв'язок з рівнем нітротирозину. Отримані дані можуть, зокрема, пояснюватися негативним впливом кінцевих продуктів глікозування та вільних радикалів на експресію рецепторного активатора ліганда kB ядерного фактора каппа В (RANKL), який стимулює диференціацію та активність остеокластів [7]. Також високі концентрації пероксинітриду можуть призводити до апоптозу остеокластів та знижувати їх активність через блокування активності катепсину К, який відіграє ключову роль у кістковій резорбції та деградації колагену [14].

Таким чином, у пацієнтів з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП має місце зниження кісткового метаболізму та інтенсифікація хронічного оксидативного стресу. Наявність взаємозв'язків між нітротирозином та показниками кісткового метаболізму може свідчити про значну роль активних форм кисню у зниженні кісткового обміну у хворих з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП.

Висновки

У результаті дослідження виявлено зниження показників кісткового метаболізму та підвищення оксидативного стресу у осіб з поєднаним перебігом ЦД 2 типу та ОП. У даній категорії хворих реєструється негативний взаємозв'язок

Перспективи подальших досліджень

Оцінити ефективність призначення антиоксидантної терапії хворим з поєднаним пере-

біж кістковим метаболізмом та оксидативним стресом, що підтверджується наявністю достовірного зв'язку між концентрацією нітротирозину з остеокальцином, дезоксиіпіридиноліном, паратгормоном та кальцитоніном.

бігом цукрового діабету 2-го типу та остеопорозом.

References (список літератури)

1. Cho N.H., Whiting D., Forouhi N. et al., (2015). IDF Diabetes Atlas, seventh edition. International Diabetes Federation. Retrieved from: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>.
2. Kanazawa I. (2017). Interaction between bone and glucose metabolism *Endocrine Journal*. 64. 1043-1053. doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0323.
3. Qian Wu, Zhao-Ming Zhong, Ying Pan, et al. (2015) Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Postmenopausal Osteoporosis. *Medical science monitor*, 21, 2428–2432. doi: 10.12659/MSM.894347
4. Makurina G.I. (2015) Nitroziruyushchiy stress pri psoriaticheskoy bolezni v sochetanii s essentsial'noy gipertenziyey [Nitrosative Stress in Psoriatic Diseases Combined with Essential Hypertension.] *Vestnik problem biologii i meditsiny*, №3, 159-165. [in Russian].
5. Azizova G.I., Dadashova A.R., Amirova M.F. (2014). Biomarkery oksidativnogo stressa i sostoyaniye antioksidantnoy sistemy pri sakharnom diabete tipa 2 [Biomarkers of oxidative stress and the state of the antioxidant system in type 2 diabetes mellitus] *Universum: Meditsina i farmakologiya: elektron. nauchn. Zhurn*, 6(7). Retrieved from: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1386>. [in Russian].
6. Vinnik YU.S., Kochetova L.V., Kulikova A.B. (2013). Ul'trazvukovaya densitometriya v diagnostike osteoartropatii u bol'nykh sakharnym diabetom [Ultrasonic densitometry in diagnocs of the osteoarthropathy at sick of the diabetes]. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 4.(139). 28-31.
7. Starup-Linde J. (2013). Diabetes, Biochemical Markers of Bone Turnover, Diabetes Control, and Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4. 21. doi: 10.3389/fendo.2013.00021.
8. Yamamoto M., Yamaguchi T., Nawata K., et al. (2012). Decreased PTH levels accompanied by low bone formation are associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*, 97(4), 1277-84. doi: 10.1210/jc.2011-2537.
9. Al-Hariri M. (2016). Sweet Bones: The Pathogenesis of Bone Alteration in Diabetes. *J Diabetes Res*. doi: 10.1155/2016/6969040
10. Gendeleka G.F. (2011). Antioksidantnaya terapiya s pomoshch'yu A-lipoyevoy kisloty (tiogammy) [Antioxidant Therapy with A-Lipoic Acid (Thiogamma)]. *Mezhdunarodnyy endokrinologicheskii zhurnal*, 5 (37), 63-68. [in Russian].
11. Zanozina O.V. (2010). Vozmozhnosti korrektsii okislitel'nogo stressa u bol'nykh sakharnym diabetom s pomoshch'yu dibikora. [Possibilities of correcting oxidative stress in patients with diabetes mellitus using dibicor]. *Farmateka*, 16, 73-76. [in Russian].
12. Gennari L., Merlotti D., Valenti R., Ceccarelli E. et al. (2012). Circulating Sclerostin Levels and Bone Turnover in Type 1 and Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, 97, 1737–1744.
13. Zhou Q., Zhu L., Zhang D., Li N., et al. (2016). Oxidative Stress-Related Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Dis*

- Markers.*, Retrieved from:
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7067984>
14. Zaytseva O.V., Shandarenko S.H., Velykyy M.M. (2015). Vplyv nitrozatyvnoho stresu na mineral'nyy metabolizm kistkovoyi tkanyny shchuriv za umov alimentarnoho osteoporozu [Influence of nitrosatitative stress on the mineral metabolism of bone

tissue of rats under conditions of alimentary osteoporosis]. *Medychna ta klinichna khimiya*, 17, 1, 5-11. [in Ukrainian].

(received 14.11.2018, published online 25.12.2018)

(одержано 14.11.2018, опубліковано 25.12.2018)